

A *let-7c* mikro-RNS vizsgálata az anyai vérplazmában magzati szívfejlődési rendellenesség esetén



Biró Orsolya, Nagy Bálint dr., Rigó János Jr. dr., Hajdú Júlia dr.,
Balogh Sára dr., Lázár Levente dr.

Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest
(Igazgató: Rigó János Jr. dr., egyetemi tanár)

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A szívfejlődési rendellenességek a leggyakoribb veleszületett fejlődési rendellenességek közé tartoznak, és vezető okai a gyermekkori elhalálozásnak. A betegség prenatalis diagnosztikáját a magzati echokardiográfia jelenti. A vizsgálat nem tartozik a rutin szűrőmódszerek közé, és megbízhatósága több paramétertől is függ. Egyre nagyobb az igény olyan biomarkerekre, amelyek segítségével kiszűrhetőek a magasabb kockázatú terhességek. Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak, amelyek egyszerű vérvétellel hozzáférhetőek. A mikro-RNS-ek (miRNS) olyan rövid, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, amelyek fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének poszttranszkripció szabályozásában. Több, a szívfejlődés folyamatában résztvevő gén expresszióját is befolyásolják, ezáltal összefüggésbe hozhatóak a szívfejlődési rendellenességekkel. Azok a miRNS-ek, amelyek expresszálódnak a placentában, kimutathatóak az anyai keringésben, és rendkívüli stabilitásuknak köszönhetően potenciális biomarkerként szolgálhatnak. A magzati eredetű miRNS-ek expressziós vizsgálata új lehetőségeket nyit a noninvazív molekuláris magzati diagnosztikában.

Anyagok és módszerek: Kutatócsoportunk célkitűzése a miRNS-ek szerepének vizsgálata a veleszületett szívfejlődési rendellenességek kialakulásában, illetve alkalmazhatóságuk felmérése a noninvazív molekuláris magzati diagnosztikában. A vizsgálatainkba 14 szívhibás magzatot hordozó és 14 egészséges magzatot viselő anyát vontunk be. Megmértük a *let-7c* miRNS expresszióját anyai plazma mintákban valós idejű PCR módszerrel, továbbá modelleztük a miRNS lehetséges hatásmechanizmusát bioinformatikai eszközök segítségével.

Eredmények és következtetések: Eredményeink szerint a *let-7c* miRNS expressziója lényegesen fokozódott a beteg minták esetében. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a *let-7c* a veleszületett szívfejlődési rendellenesség potenciális biomarkere, és a közeljövőben a magzati szívultrahanggal kombinálva alkalmazható lehet a betegség kiszűrésére.

KULCSSZAVAK

veleszületett szívfejlődési rendellenesség, mikro-RNS, biomarker, noninvazív prenatalis diagnosztika

Orsolya Biró, Bálint Nagy, MD, János Rigó Jr., MD, Júlia Hajdu, MD, Sára Balogh, MD, Levente Lázár MD

Let-7c in maternal circulation as a potential biomarker for congenital heart defect

ABSTRACT

Objectives: Congenital heart defects (CHD) are the most common fetal malformations and the leading cause of perinatal death. Fetal echocardiography is the most widely used diagnostic tool for CHD, however, it does not belong to the routine screening examinations, and its reliability depends on several parameters. There is a great need for biomarkers which could detect CHD easily with high accuracy. Cell-free fetal nucleic acids are present in the maternal circulation and can be measured by a simple blood test. MiRNAs are short, non-coding RNA molecules that play an important role in the regulation of eukaryotic gene expression. MiRNAs which contributes to heart development are associated with congenital heart diseases. Some of them are expressed by the placenta and can be found in maternal circulation in consequence.

Materials and methods: In this study, our aim was to analyze the *let-7c* miRNA abundance in maternal plasma samples by RT-PCR method and to model the possible triggering effect of *let-7c* miRNAs in congenital heart disease by bioinformatic analysis. Peripheral blood samples were collected from 28 pregnant women: in 14 cases the fetus had CHD, and in 14 control cases no CHD was diagnosed.

Results and conclusions: Significant difference was measured in the expression of *let-7c* concentration between the affected and the control group, therefore, *let-7c* seems to be a potential biomarker for fetal CHD. We suppose that the detection of heart development related miRNAs reveals new opportunities for congenital heart defect research and diagnosis.

KEY WORDS

congenital heart diseases, microRNA, biomarker, non-invasive prenatal diagnostics

BEVEZETÉS

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (VSzR) a szív és a nagy erek strukturális és funkcionális defektusaival járó kórképek. A leggyakoribb kongenitálistanomáliákhoz tartoznak, és vezető okai a csecsemő- és gyermekkorai elhalálozásnak [1]. A betegséggel sújtott újszülöttek több mint felének kritikus az állapota és legtöbbször sebészeti beavatkozásra van szükségük. A rendellenesség súlyosságától és sebészeti korrigálhatóságától nagymértékben függ a gyermek várható élettartama, ezért fontos a terhesség alatti felismerés. Az idejében detektált szívbetegség lehetővé teszi az esetleges életmentő kezelések elvégzését, illetve megalapozza a társuló kórképekre való szűrést is [2].

A veleszületett szívfejlődési rendellenesség születés előtti diagnosztikája magzati echokardiográfiaváltörténi [3]. Megbízhatósága több paramétertől is függ, mint például az anyai súly, a berendezés minősége és a vizsgáló szakértettség [4]. Ebből kifolyólag nagy az igény az olyan biomarkerekre, amelyeket a magzati szívultrahanggal kombinálva növelhető a vizsgálat diagnosztikus értéke. Széles körűen elterjedt a nyaki redő vastagságának a mérése [5], továbbá összefüggést mutattak ki egyes, a terhesség alatt vizsgált szérumban markerek (beta-hCG és PAPP-A) és a veleszületett szívhibák megjelenése között [6].

Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak. A szabad nukleinsavak egyszerű vérvétellel hozzáférhetőek [7]. A szabad magzati eredetű nukleinsavak prenatális diagnosztikai alkalmazása napjainkban egyre szélesebb körű: alkalmazzák magzati nem (nemhez kötött betegségek szűrésére) és vércsoport meghatározásra, apai allél által meghatározott örökletes betegségek és számbeli kromoszóma eltérések szűrésére [8].

A mikroRNS-ek (miRNS) olyan rövid, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, melyek fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének posztranszkripció szabályozásában [9]. Több, a szívfejlődés folyamatában résztvevő gén expresszióját is befolyásolják, ezáltal összefüggésbe

hozhatóak a szívfejlődési rendellenességekkel [10]. Azok a miRNS-ek, amelyek expresszálódnak a placentában, kimutathatóak az anyai keringésben, és rendkívüli stabilitásuknak köszönhetően potenciális biomarkerként szolgálhatnak [11]. A magzati eredetű miRNS-ek expressziós vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában.

A *let-7* miRNS család tagjai konstitutívan expresszálódnak a szív- és érrendszer főbb sejtjeiben, beleértve a vaszkuláris simaizomsejteket, az endothel sejtet és a koszorúér simaizomsejtjeit [12, 13]. Coppola és munkatársai 2013-ban kísérletekkel bizonyították, hogy a *let-7c* részt vesz a cardiomyogenesis szabályozásában: célpontja egy olyan metil-transzferáz enzim (*Ezh2*), amely kulcsfontosságú, szívfejlődést szabályozó transzkripció faktorokat csendesít (ezáltal a miRNS serkenti a folyamatot) [14]. A *let-7c* prekurzora a humán 21-es kromoszómán kódolt (21p11.1). A Down-szindróma, más néven 21-es triszómia gyakran társul szívfejlődési rendellenességgel [15], ezért összefüggés feltételezhető a *let-7c* megemelkedett kópiaszáma és a szívhibák megjelenése között.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatok elvégzéséhez 28 várandóstól gyűjtöttünk mintát. A 14 beteg eset (1. Táblázat) kiválasztásánál az alábbi kritériumokat vettük figyelembe: 1) a magzat pozitív echokardiográfiai lelete, 2) citogenetikai vizsgálat nem igazolódott aneuploidia, 3) a spontán fogant terhesség 4) nem ikerterhesség, 5) az anya kórtörténetében nem szerepel kardiovaszkuláris megbetegedés. A kontroll csoportban 14, a beteg csoporttal életkor és a vérvételkor terhességi kor alapján összehasonlítható várandós szerepelt (2. Táblázat).

miRNS extrakció

Az anyai perifériás vérmintákat zárt vérvételi rendszer segítségével vettük le. A mintákat EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük. A vérmintákból *Eppendorf 5810 R (Eppendorf*

1. táblázat A betegcsoportban előforduló szívfejlődési rendellenességek

Minta-szám	Szívfejlődési rendellenesség
1	Ventricularis Septum Defectus (VSD), Pulmonalis Atresia (PA)
2	Hypoplasias Balszívfél Syndroma (HLHS), Aorta Atresia (AA)
3	Hypoplasias Balszívfél Syndroma (HLHS), Aorta Atresia (AA)
4	Atrioventricularis Septum Defectus (AVSD)
5	Univentricularis Szív (UVH), Nagyér Transpositio (TGA)
6	Atrioventricularis Septum Defectus (AVSD), Pulmonalis Atresia (PA)
7	Pulmonalis Atresia (PA)
8	Hypoplasias Balszívfél Syndroma (HLHS)
9	Ventricularis Septum Defectus (VSD)
10	Hypoplasias Jobbszívfél Syndroma (HRHS)
11	Fallot Tetralógia (TOF), Kettős kiáramlású Jobb Kamra (DORV)
12	Atrioventricularis Septum Defectus (AVSD)
13	Hypoplasias Balszívfél Syndroma (HLHS)
14	Atrioventricularis Septum Defectus (AVSD)

2. táblázat A vizsgálatokban résztvevő édesanyák átlagos életkora és a terhesség kora. VSzR: Veleszületett szívfejlődési rendellenesség, p: p-érték

	VSzR (n=14)	Kontroll (n=14)	p
Anya életkora (év)	32,5 (20-38)	31,5 (24-39)	0,33
Terhességi kor (hét)	20,9 (15-25)	19,4 (13-33)	0,99

AG, Hamburg, Németország) típusú centrifuga segítségével elválasztottuk a plazmát. A mintákat 10 percig 2,500 rpm fordulatszámon, majd a leszívott felülúszót 10 percig 15,500 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. A plazmából miRNS extrakciót végeztünk a NucleoSpin® miRNA Plasma (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország) kit felhasználásával, a gyártó leírásának megfelelően.

Össz-miRNS koncentrációmérés

A kapott minták össz-miRNS koncentrációját Nanodrop 1000 UV-VIS spektrofotométer (Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA) segítségével határoztuk meg. RNA-40 beállítással dolgoztunk, és az egyes mérésekhez 2 µl mintát használtunk fel.

cDNS szintézis és RT-PCR

A miRNS minták reverz transzkripcióját a miScript® II RT Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) felhasználásával végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően. A RT-PCR reakciók kivitelezéséhez a LightCycler® FastSart DNA Master SYBR Green I kitet (Roche Ltd., Penzberg, Németország) hasz-

náltuk. A reakciót a let-7c miRNS-re és a kontrollu6snRNS-re specifikus primerekkel (miRCURY LNA™ PCR primer set, Exiqon A/S, Vedbæk, Dánia) hajtottuk végre, a gyártó leírásának megfelelően. A mérések során a globin háztartási gént alkalmaztuk kalibrátorként, előre meghatározott koncentrációkban (15, 1,5, 0,15, 0,015 ng/µl).

A RT-PCR reakciókat a Light Cycler® 4.05 szoftverrel dolgoztuk fel. Az egyes mintákhoz tartozó let-7c és u6 koncentrációkat Excel táblázatban (Microsoft Co., Seattle, USA) rögzítettük, és további számításokat végeztünk. Az adatok normalizálása a következő módon történt: az egyes mintákban lévő let-7c koncentrációt elosztottuk az ugyanabban a mintában mért u6 koncentrációval, majd a kapott hányadost megszoroztuk az összes mintában átlagosan mért u6 koncentrációval.

Bioinformatikai analízis

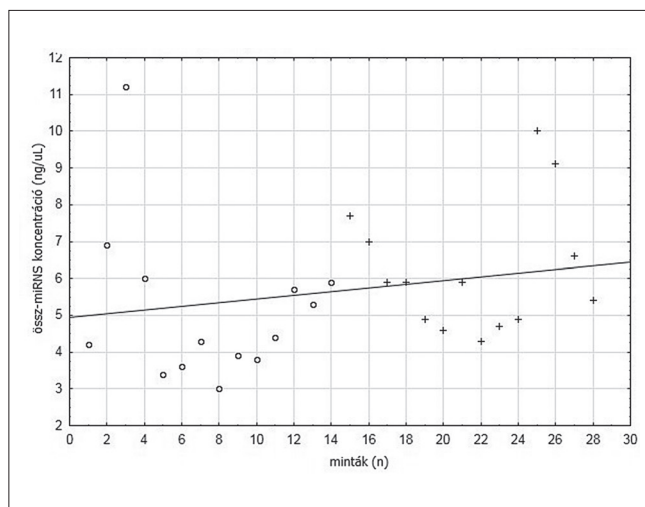
Az Uniprot[16] és a GeneOntology [17] internetes adatbázisok felhasználásával olyan fehérje kódoló géneket kerestünk, melyek részt vesznek a szívfejlődés szabályozásában. A kapott géneket a miRWalk [18] webszerverrel vizsgáltuk tovább, amely több miRNS-target predikciós programot kombinál. Mi ezek közül a DianamicroT [19], miRanda [20] és Tarbase [21] eszközöket alkalmaztuk, amelyek különféle paramétereket vesznek figyelembe a predikció kiszámításánál (seed régió komplementaritás, konzerváltság stb.). AmiRTarBase [22] adatbázis segítségével meghatároztuk, hogy a prediktált miRNS-mRNS interakciókat validálták-e valamilyen kísérleti módszerrel (microarray, RT-PCR stb). Az utolsó lépésben megvizsgáltuk, hogy a prediktált target gének közül volt-e olyan, aminek a mutációját összefüggésbe hozták szívfejlődési rendellenességgel. Erre a célra a CHDWiki [23] adatbázist alkalmaztuk forrásként.

Statisztika

A statisztikai elemzéseket a STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, USA) szoftverrel végeztük el. Az eredményeket átlag±szórás formában adtuk meg, esetenként megjelenítettük a medián, minimum, maximum és percentilis értékeket is. A csoportok közötti eltérések statisztikai szignifikanciáját a Student-féle t-próbával számoltuk ki, szignifikáns különbségnek a p<0,05 értéket vettük.

EREDMÉNYEK**Össz-miRNS koncentráció**

A spektroszkópiai mérések alapján minden anyai plazmából sikeres volt a miRNS extrakció. A mintákban mért össz-miRNS koncentrációkban nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport között, a kontroll mintákban átlago-



1. ábra. Az anyai plazma mintákban mért össz-miRNS koncentrációk. 1-14: beteg, 15-28: kontroll Szórásdiagram. Jelölések: o: beteg minták, +: kontroll minták. A mintákban mért össz-miRNS koncentrációkban nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport között.

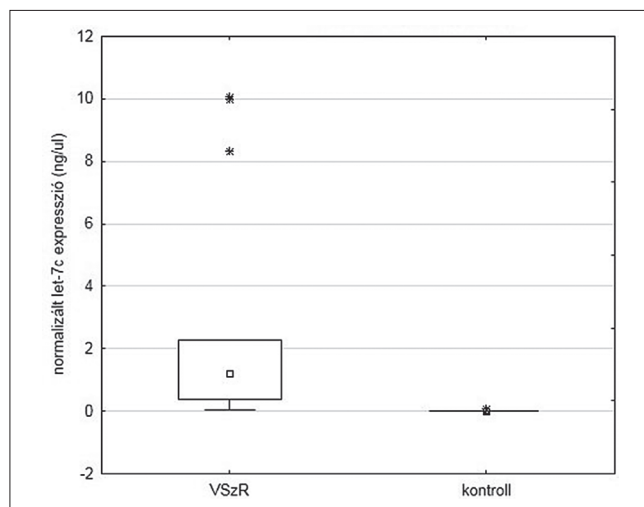
san $6,36 \pm 2,11$ ng/ μ l, a betegekben pedig $5,11 \pm 2,10$ ng/ μ l volt a miRNS koncentráció ($p=0,23$) (1. Ábra).

A let-7c mennyiségének meghatározása anyai plazma mintákban

A miRNS expressziós vizsgálatok elvégzéséhez optimalizáltuk a RT-PCR reakciót. A módszer segítségével hatékonyan detektáltuk az *u6* snRNS-t és a *let-7c* miRNS-t anyai plazmában. A kóros esetekben *alet-7c* miRNS mennyisége szignifikánsan emelkedett a kontroll csoportban mért mennyiséghez viszonyítva ($2,81 \pm 3,70$ ng/ μ l illetve $0,017 \pm 0,023$ ng/ μ l) ($p < 0,05$) (2. Ábra).

A bioinformatikai analízis eredményei

A miRWalk webszerver alkalmazásával a vizsgált 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 98 a *hsa-let-7c* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). Negyven-négyet ezek közül mind a három felhasznált predikciós



2. ábra. A beteg és kontroll csoportban mért *let-7c* miRNS koncentrációk medián értékei Doboza ábra. Jelölések: □: 25-75% interkvartilis tartomány (IQR), ◻: medián, I: minimum és maximum értékek a normál tartományban, *: kiugró értékek. A kóros esetekben a *let-7c* miRNS mennyisége szignifikánsan emelkedett a kontroll csoportban mért mennyiséghez viszonyítva.

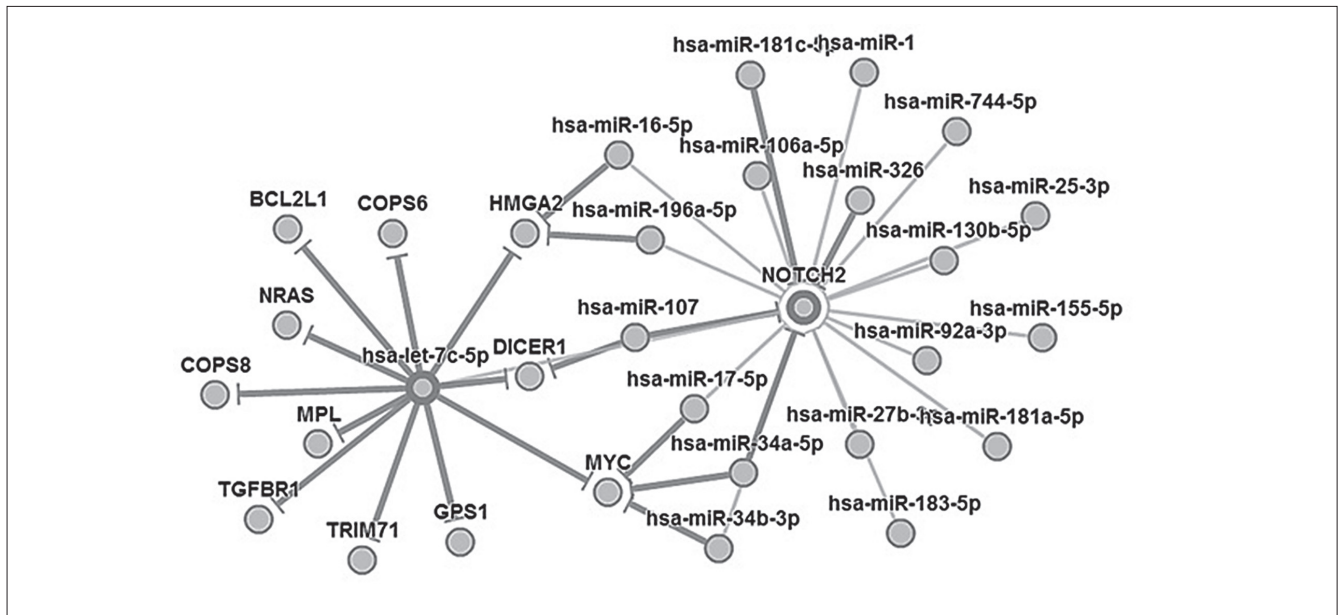
program potenciális célpontként határozott meg. A 44 találat közül négyet validáltak kísérleti módszerekkel is: *DICER1* (Western blot [24]), *TGFBR1* (Western blot, riporter esszé, RT-PCR [25]), *NOTCH2* (újgenerációs szekvenálás [26], 15. Ábra) és *TAZ* (újgenerációs szekvenálás [26]); 6 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezet: *ACVR2B* (non-szindromikus VSZR [27]), *CHD7* (CHARGE szindróma [28]), *HAND2* (non-szindromikus VSZR [29]), *NOTCH2* (Alagille szindróma [30]), *SH3PXD2B* (Frank-Ter Haar szindróma [31]) és *TBX5* (Holt-Oram szindróma [32]) (3. Táblázat).

MEGBESZÉLÉS

A humán keringésben fellelhető szabad miRNS-ek szintje relative állandó és stabilitásukat szélsőséges körülmények között is megőrzi. Ezen tulajdonságainak köszönhetően,

3. táblázat. A *let-7c* miRNS szívfejlődési rendellenességgel kapcsolatba hozható prediktált célgénjei

Gén neve	miRNS neve	Predikció (3/#)	Validálás	Szívfejlődési rendellenesség
ACVR2B	let-7c-5p	3	nem	igen
CHD7	let-7c-5p	3	nem	igen
DICER1	let-7c-5p	3	igen	nem
HAND2	let-7c-5p	3	nem	igen
NOTCH2	let-7c-5p	3	igen	igen
SH3PXD2B	let-7c-5p	3	nem	igen
TAZ	let-7c-5p	3	igen	nem
TBX5	let-7c-5p	3	nem	igen
TGFBR1	let-7c-5p	3	igen	nem



3. ábra. *hsa-let-7c* - *NOTCH2* interakció (forrás: miRTarbase)

A *let-7c* miRNS és a *NOTCH2* fehérje között feltételezett szabályozási kapcsolatrendszer sémája.

Az ábrán látható, hogy a miRNS mely más gének expresszióját szabályozza, illetve hogy a fehérje milyen egyéb miRNS-ek szabályozása alatt áll. A vonalak vastagsága a validálási módszer megbízhatóságát jelöli: vastag: erős bizonyíték (pl. RT-PCR), vékony: kevésbé erős bizonyíték (pl. újgenerációs szekvenálás).

a keringő miRNS-ek potenciális biomarkerként szolgálhatnak különböző kórképek esetében. Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben. Számos olyan található közöttük, amely részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel.

A *let-7* miRNS család tagjai (13 db miRNS, köztük a *let-7c*) konstitutívan expresszálódnak a szív- és érrendszer főbb sejtjeiben, beleértve a vaszkuláris simaizom sejteteket, az endothel sejteteket és a koszorúér simaizom sejtjeit [12]. Babiary és munkatársai 2012-ben hiPSC (human induced pluripotent stem cells) eredetű szívizomsejteken transzkriptomikai vizsgálatot végeztek, melynek eredményül azt kapták, hogy a *let-7* miRNS család egy fontos csomópontja a cardiomyocita differenciációt szabályozó miRNS-mRNS hálózatnak [13]. A *let-7* miRNS család tagjai fokozottan expresszálódnak a méhlepényben [33], ezért feltehetően megtalálhatóak az anyai keringésben is.

Coppola és munkatársai 2013-ban kísérletekkel bizonyították, hogy a *let-7c* részt vesz a cardiomyogenesis szabályozásában: célpontja egy olyan metil-transzferáz enzim (*Ezh2*), amely kulcsfontosságú, a szívfejlődésben szerepet játszó transzkripció faktorokat csendesít (ezáltal a miRNS serkenti a folyamatot) [14]. Thum és munkatársai azt találták, hogy a *let-7c* expressziós mintázata nagy hasonlóságot mutat krónikus szívelégtelenségben és magzati szívben. Ebből arra következtettek, hogy a betegség

a fetális gén program reaktivációjával jellemezhető, és ezt a változást vélhetően miRNS-ek (köztük a *let-7c*) idézik elő [34].

Az általunk végzett bioinformatikai analízis eredményei szerint a *NOTCH2* gén a *let-7c* miRNS fontos célpontja (3. Ábra) és a gén csendesítése szívfejlődési rendellenességhez vezethet: a gént a felhasznált predikciós programok a *hsa-let-7c* potenciális célpontjaként határozták meg; kísérletesen validálták a miRNS-mRNS interakciót [26]; továbbá a gén mutációja a szív hibás fejlődéséhez vezet. A *NOTCH2* fontos szerepet játszik a velőcső eredetű vaszkuláris simaizom sejtek proliferációjának szabályozásában és nélkülözhetetlen a szív kiáramlási pályájának megfelelő kifejlődéséhez [35]. Az Alagille szindróma (OMIM:610205) szívfejlődési rendellenességgel társuló komplex, dominánsan öröklődő kórkép. A betegség kialakulásának oka a Notch szignalizációs útvonal diszfunkciója, melyért legtöbbször a *JAG1* gén mutációi, kisebb részben pedig a *NOTCH2* gén mutációi tehetőek felelőssé [30]. Mc Daniell és munkatársai olyan családokat vizsgáltak, amely kép *JAG1* génnel rendelkeztek. A *NOTCH2* gén hibáit két családban fedezték fel: az egyik esetben a 33. exonsplice akceptor helyét érinti a mutáció (c.5930-1G→A); a másik esetben a 8. exonbantaláltak non-szinonim mutációt (c.1331G→A). A Hajdu-Cheaney szindróma (OMIM:102500) egy ritka, autoszómális domináns módon öröklődő kötőszöveti rendellenesség. Fő jellemzője az acro-osteolysis, mely gyakran társul

polycystas vesebetegséggel és szívfejlődési rendellenességgel. A kórkép megjelenését legtöbbször a *NOTCH2* gén mutációi okozzák [36, 37]. Ez a tény tovább erősíti azt a feltevésünket, miszerint a géntermék hiánya hozzájárulhat a szív hibás fejlődéséhez.

Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a *let-7* miRNS a veleszületett szívfejlődési rendellenesség potenciális biomarkere, és a közeljövőben a magzati szív-ultrahanggal kombinálva alkalmazható lehet a betegség kiszűrésére.

Érdekltségi nyilatkozat:

A szerzőnek nincsenek érdekltségei.

IRODALOM

- [1] Capozzi G, Caputo S, Pizutti R, et al. Congenital heart disease in live-born children: incidence, distribution, and yearly changes in Campani Region. *J Cardiovasc Med* 2008;9(4):368-374.
- [2] Artz W, Tulzer G. Fetalsurgery for cardiaclesions. *Prenatal Diagnosis* 2011;31:695-698.
- [3] Masszi Gy, Hajdú J. Magzati kardiológiáról gyermekgyógyászoknak. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle* 2014; XXI:1-4.
- [4] Tegnander E, Eik-Nes SH. The examiner's ultrasound experience has a dignificant impact on the detectionrate of the congenital heart defects at the second-trimester fetal examination. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;28(1):8-14.
- [5] Bruns RF, Moron AF, Murta CG, et al. The role of nuchal translucency in the screening for congenital heart defects, *ArqBrasCardiol* 2006;87(3):307-314.
- [6] Jelliffe-Pawolowski LL, Walton-Haynes L, Currier RJ. Using second trimester ultrasound and maternal serum biomarker data to help detect congenital heart defect sinpregnancies with positive triple-marker screening results. *Am J MedGenet A* 2008; 146A(19):2455-2467.
- [7] Tounta G, Kolialexi A, Papantoniou N, et al. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal nucleicacid sin maternal plasma: Progress overview beyond predictive and personalized diagnosis. *EPMA Journal* 2011; 2:162-171.
- [8] Lazar L, Nagy Gy R, Nagy B, Rigó J Jr. A neminvaszivpraenatalis diagnosztika lehetőségei. In: Praenatalis Molekuláris Genetika. In: Nagy B, Lázár L, Rigó J. Jr. Semmelweis Kiadó Budapest, 2011; 158:174.
- [9] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ, et al. The Long and Short of MicroRNA. *Cell* 2013; 153:516-519.
- [10] Yu Z, Han S, Hu P, et al. Potential role of maternal serum microRNAsas biomarker for fetal congenital heart defects, *Medical Hypotheses* 2011;76: 424-426.
- [11] Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S. et al., „MicroRNA expression profiles of trophoblasticcells”, *Placenta* 2012, 33 :725-734.
- [12] Bao MH, Feng X, Zhang YW, Lou XY, Cheng Y, Zhou HH. Let-7 in cardiovasculardiseases, heart development and cardiovascular differentiation from stemcells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:23086-23102.
- [13] Babiarz JE, Ravon M, Sridhar S, et al. Determination of the Human Cardiomyocytem RNA and miRNA Differentiation Network by Fine-Scale Profiling. *StemCells And Development* 2012; 21 (11): 1956-1965.
- [14] Coppola A, Romito A, Borel C, et al. Cardiomyogenesis is controlledbythe miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *StemCell Research* 2014; 12:323-337.
- [15] Freeman SB, Bean LH, Allen EG, et al. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: report from the National Down Syndrome Project. *Genet. Med.* 2008; 10:173-180.
- [16] The UniProt Consortium; UniProt: a hubfor protein information; *NucleicAcids Res.* 2015; 43: D204-D212.
- [17] The GeneOntology Consortium. Geneontology: tool for the unification of biology. *NatGenet.* May 2000;25(1):25-9.
- [18] Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by „walking” the genes of 3 genomes. *Journal of Biomedical Informatics* 2011; 44:839-7.
- [19] Maragkakis M; Reczko M; Simossis VA, et al., DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Research* 2009; 37:W273-6.
- [20] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRN Atargets. *PLoSBIol.* 2005;3(7):e264.
- [21] Vlachos S, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally support edmiRNA: mRNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 2015; 43:D153-9.
- [22] Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, et al. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validate dmiRNA-target interactions. *NucleicAcids Res.* 2014;42:D78-85.
- [23] Barriot R, Breckpot J, Thienpont B, Brohée S, Van Vooren S, Coessens B, et al. Collaboratively charting

- the gene-to-phenotype network of human congenital heart defects. *GenomeMed.* 2010;2(3):16.
- [24] Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicerexpression and constitutes a negative feed backloop. *Carcinogenesis* 2008;29(11):2073-2077.
- [25] Tzur G, Israel A, Levy A, et al. Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNA sin human liver development. *PLoSOne* 2009; 20;4(10):e7511.
- [26] Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the human miRNA interactomeby CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 2013, 153(3):654-665.
- [27] Kosaki R, Gebbia M, Kosaki K, et al. Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am J MedGenet* 1999;82(1):70-76.
- [28] Aramaki M, Udaka T, Kosaki R, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Pediatr.* 2006;148(3):410-414.
- [29] Shen L, Li XF, Shen AD, et al. Transcription factor HAND2 mutations in sporadic Chinese patients with congenital heart disease. *Chin Med J. (Eng)* 2010;123(13):1623-1627.
- [30] McDaniel R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, et al. NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogenous Disorder of the Notchsignaling Pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;79:169-173.
- [31] Iqbal Z, Cejudo-Martin P, Brouwer A, et al. Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome., *Am J HumGenet.* 2010; 86(2):254-261.
- [32] Gruenauer-Kloevekorn C, Froster UG. Holt-Oramsyndrome: a new mutation in the TBX5 geneintwounrelated families. *AnnGenet.* 2003; 46(1):19-23.
- [33] Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and the third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304: E836-E843.
- [34] Thum T, Galuppo P, Wolf C., et al. MicroRNA sinthe human heart: A cluetofetalgenere programmingin heart failure. *Circulation* 2007; 116:258-267.
- [35] Varadkar P, Kraman M, Despres D, et al. Notch2 is required for the proliferation of cardiacneural crest-derived smooth muscle cells. *Developmental Dynamics* 2008; 237:1144-1152.
- [36] Isidor B, Lindenbaum P, Pichon O, et al. Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rareskeletaldisorder with osteoporosis. *Nature Genet.* 2011; 43: 306-308.
- [37] Simpson MA, Irving MD, Asilmaz E, et al. Mutation sin NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive boneloss. *Nature Genet.* 2011; 43: 303-305.

Levelezési cím:

Dr. Nagy Bálint
 Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati
 Klinika
 1088 Budapest, Baross u. 27.
 E-mail: nagy.balint@noi1.sote.hu